Iranian Food Science and Technology Research Journal
Homepage: https://ifstrj.um.ac.ir

Research Article
Vol. 20, No. 5, Dec.-Jan. 2024, p. 547-558

Optimization of Effective Factors on the Antioxidant and Antimicrobial Activity of Sesame Meal Protein Hydrolysate with Fermentation by *Bacillus subtilis*

P. Raei[1], M. Khomeiri[2*], A. Sadeghi Mahoonak[2], A. Moayedi[3], M. Kashiri[3]

1, 2 and 3- Ph.D. Student, Professor and Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: khomeiri@gau.ac.ir)

Received:	27.01.2024	**How to cite this article:** Raei, P., Khomeiri, M., Sadeghi Mahoonak, A., Moayedi, A., & Kashiri, M. (2024). Optimization of effective factors on the antioxidant and antimicrobial activity of sesame meal protein hydrolysate with fermentation by *Bacillus subtilis*. *Iranian Food Science and Technology Research Journal, 20*(5), 547-558. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2024.86575.1311
Revised:	28.02.2024	
Accepted:	03.03.2024	
Available Online:	21.11.2024	

Introduction

Nowadays, antibiotic resistance is increasing in all parts of the world and is emerging and expanding globally. Due to their natural antimicrobial properties and low tendency to develop bacterial resistance, antimicrobial peptides can be a good candidate as an alternative to synthetic antibiotics. Bioactive peptides are produced using enzymatic hydrolysis by enzymes extracted from microorganisms and plants, digestive enzymes, and fermentation by proteolytic starter cultures. Enzymatic hydrolysis of proteins is performed by commercial proteases or a combination of several proteolytic enzymes. Commercial proteases are expensive due to their specificity. Among the strategies for protein hydrolysis with the aim of obtaining bioactive peptides is microbial fermentation, which is more environmentally friendly and has a high potential for use in industry due to its relatively low cost compared to commercial enzymes. It is a suitable method for the hydrolysis of sesame meal protein. *Bacillus* species are bacteria that have high proteolytic activity and are able to produce different endopeptidases in the fermentation medium. The activity of endopeptidases in the environment containing proteins causes the production of peptides with small sizes and free amino acids in higher amounts compared to enzymatic hydrolysis, which is one of the advantages of using *Bacillus* species with high proteolytic activity compared to pure enzymes. In general, the purpose of this research was to produce sesame meal protein hydrolysate by fermentation with *Bacillus subtilis* and to investigate its antimicrobial and antioxidant activity.

Materials and Methods

In this study, at the first step, sesame meal was defatted with hexane at a ratio of 1:5, then it was dried and sesame meal protein isolate was extracted, and the optimization of fermentation conditions was determined by the response surface methodology (RSM). Independent variables, including temperature (30 to 45 ˚C), time (12 to 36 h), and substrate concentration (2 to 6%), were considered. The antioxidant properties of the treatments, including DPPH radical scavenging activity, ferric ion reducing power, and antimicrobial activity, were investigated, and the optimum treatment was selected. Then the protein hydrolysate was freez-dried and stored at -20 °C.

Results and Discussion

According to the results**,** temperature (39.68 °C), time (30.07 h), and substrate concentration (4.85%) were selected as optimum conditions. Under these conditions, DPPH radical scavenging activity and ferric ion reducing power of hydrolysate were 63.57% and 0.9951 (absorbance at 700 nm), respectively. The inhibition percentages of *Staphylococcus aureus* (59.58%), *Escherichia coli* (6.55%), *Listeria monocytogenes* (62.43%), and *Clostridium perfringens* (50.97%) were obtained in the optimized condition. *Bacillus subtilis*, in the

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2024.86575.1311

presence of sesame meal protein, showed significant ($p<0.05$) protease activity over time. After 48 hours, the clear zone diameter was determined to be 22 mm. The clear zone created by this strain showed that *Bacillus subtilis* has high proteolytic activity and can be a suitable bacterium for hydrolyzing sesame meal protein with the aim of obtaining hydrolysates with the highest antimicrobial and antioxidant activities. The antimicrobial activity of the protein hydrolysate can be due to the higher degree of hydrolysis. By increasing the hydrolysis time, peptides with low molecular weight are produced, which cause better interaction with the microbial cell membrane, disrupt the membrane, and lead to the inhibition of the microorganism. According to the results, the sesame meal protein hydrolysate showed more inhibitory effect against gram-positive bacteria than gram-negative bacteria (*Escherichia coli*). Researchers reported that the difference in sensitivity to antimicrobial compounds between gram-positive and gram-negative bacteria can be attributed to the structure and composition of the cell envelope (cytoplasmic membrane or outer membrane, and cell wall). In general, the bioactivity properties of protein hydrolysate depend on the amino acid composition, sequence, and molecular weight of the amino acids. The antioxidant activity can be due to the high content of polar and aromatic amino acids. By further hydrolysis of proteins, peptides and polar free amino acids are produced that interact with free radicals and converted into safe and stable intermediate products.

Conclusion

In this study, *Bacillus subtilis* strain was used to ferment sesame meal protein, which is a rich source of protein, to produce protein hydrolysate with maximum antimicrobial and antioxidant activities. Results showed that the protein hydrolysate obtained from sesame meal protein isolate had antimicrobial and antioxidant activities. It can be used as a natural antimicrobial or antioxidant agent in the formulation of food or pharmaceutical industry to improve the health of society.

Keywords: Antioxidant, Antimicrobial, Fermentation, Sesame meal protein hydrolysate

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
https://ifstrj.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۲۰، شماره ۵، آذر-دی ۱۴۰۳، ص. ۵۴۷-۵۵۸

بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر ویژگی آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کنجد با تخمیر توسط *باسیلوس سابتیلیس*

پریسا راعی[۱]- مرتضی خمیری[۲*]- علیرضا صادقی ماهونک[۲]- علی مؤیدی[۳]- محبوبه کشیری[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۲

چکیده

استفاده از پروتئین‌های هیدرولیز شده یا پپتیدهای حاصل از آنها با خاصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی یکی از روش‌های جایگزین ترکیبات شیمیایی ضد میکروب و آنتی‌اکسیدان می‌باشد. هیدرولیز میکروبی جهت رسیدن به این هدف نسبت به روش‌های هیدرولیز آنزیمی و شیمیایی روشی کارآمد و اقتصادی می‌باشد. در این پژوهش ایزوله پروتئین کنجاله کنجد از طریق فرآیند تخمیر توسط *باسیلوس سابتیلیس* با هدف دستیابی به بیشینه فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شد. بهینه‌سازی شرایط تخمیر (پارامترهای تخمیر شامل دما ۳۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۲ تا ۳۶ ساعت و غلظت سوبسترا ۲ تا ۶ درصد) به روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی جهت دستیابی به بیشترین فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی انجام شد. دمای تخمیر (۳۹/۶۸ درجه سانتی‌گراد)، زمان (۳۰/۰۷ ساعت) و غلظت سوبسترا (۴/۸۵ درصد) به‌عنوان شرایط بهینه انتخاب شد. تحت این شرایط قدرت مهار کنندگی رادیکال DPPH و احیاء کنندگی یون آهن به‌ترتیب ۶۳/۵۷ ٪ و ۰/۹۹۵۱ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) به‌دست آمد. برای تعیین اثر ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده از روش کدورت‌سنجی استفاده شد و درصد مهار کنندگی *استافیلوکوکوس اورئوس* ۵۹/۵۸ ٪، *اشرشیاکلای* ۴۶/۵۵٪، *لیستریا مونوسیتوژنز* ۶۲/۴۳ ٪ و *کلستریدیوم پرفرنجنس* ۵۰/۹۷٪ بدست آمد. آزمون پروتئازی با روش نقطه‌گذاری انجام شد. *باسیلوس سابتیلیس* در حضور پروتئین کنجد فعالیت پروتئازی به‌صورت معنی‌دار ($p<0.05$) در طی زمان نشان داد. به‌طوری‌که در مدت زمان ۴۸ ساعت هاله شفاف به قطر ۲۲ میلی‌متر ایجاد کرد. نتایج حاصل نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کنجد توسط *باسیلوس سابتیلیس* دارای فعالیت زیست‌فعالی مناسبی است و از آن می‌توان به‌عنوان ترکیب ضد میکروب و آنتی‌اکسیدان طبیعی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کنجد، تخمیر، ضد میکروبی

مقدمه

یکی از جدی‌ترین عواملی که سلامت عمومی افراد را به خطر می‌اندازد مقاومت به ترکیبات ضد میکروبی است که علت آن استفاده بیش از حد و سوء استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. با توجه به پیش بینی‌های انجام شده، مرگ و میر ناشی از عفونت‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها تا سال ۲۰۵۰ به ۱۰ میلیون نفر می‌رسد که به یک مشکل بزرگ در جهان تبدیل شده است و نیاز است استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به حداقل برسد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در تمام نقاط جهان در سطح خطرناکی در حال افزایش است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی، به مقاومت میکروارگانیسم در برابر داروی ضد میکروبی اطلاق می‌گردد که معمولا برای درمان آن عفونت استفاده می‌شود. باکتری‌های مقاوم جدید در حال ظهور و گسترش در سطح جهانی هستند و توانایی افراد را برای درمان بیماری‌های عفونی رایج تهدید می‌کنند (Chokshi *et al.*, 2019). بیماری‌های عفونی توسط میکروارگانیسم‌ها ایجاد می‌شوند و برای درمان آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر نیاز است. بیماری‌های عفونی که در دهه ۱۹۶۰ با آنتی‌بیوتیک‌ها درمان می‌شدند (مانند سل، سوزاک یا ذات‌الریه) ممکن است امروزه به‌دلیل مقاومت

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: khomeiri@gau.ac.ir)
https://doi.org/10.22067/ifstrj.2024.86575.1311

به درمان پاسخ ندهند (Morone *et al*., 2016). پپتیدهای ضد میکروبی را می‌توان به‌طور طبیعی تقریباً در تمام حوزه‌های زندگی به عنوان بخشی از سیستم ایمنی ذاتی برای مبارزه با ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچها و حتی سلول‌های سرطانی مورد استفاده قرار داد (Cheng *et al*., 2014). پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs)[1] به دلیل خواص ضد میکروبی طبیعی و تمایل کم برای ایجاد مقاومت باکتریایی، گزینه مناسبی برای طراحی عوامل ضد میکروبی جدید برای کاربردهای خاص هستند که توجه محققان را به خود جلب کرده‌اند. (AMPs) آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی در نظر گرفته می‌شوند و توسط همه گونه‌های زنده شناخته‌شده از جمله باکتری‌ها، قارچها و گیاهان تولید می‌شوند که می‌توانند به‌عنوان جایگزین جدید آنتی بیوتیک‌های معمولی به کار روند (Wang *et al*., 2016).

پپتیدهای زیست‌فعال از طریق هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم‌های تجاری یا با تخمیر توسط باکتری‌های تخمیر کننده پروتئولیتیک تولید می‌شوند و بر اساس ترکیب و موقعیت قرارگیری اسیدهای آمینه دارای عملکردهای مختلف از جمله اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهاب، کاهش دهندگی کلسترول، ضد فشار خون، ضد سرطان و غیره می باشند (Ortiz-Martinez *et al*., 2014). هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها توسط پروتئازهای تجاری یا ترکیبی از چندین آنزیم پروتئولیتیک انجام می‌شود. پروتئازهای تجاری به‌دلیل اختصاصی بودن گران هستند. استفاده از این آنزیم‌ها برای هیدرولیز پروتئین به محصولات جدید با ارزش افزوده بالا از نظر اقتصادی کارآمد نخواهد بود. یکی از راهبردهابرای هیدرولیز پروتئین با هدف دستیابی به پپتیدهای زیست فعال تخمیر میکروبی است که مقرون به صرفه‌تر و سازگار با محیط زیست است (Moayedi *et al*., 2016). میکروارگانیسم‌ها در طی فرآیند تخمیر پروتئازهایی را ترشح می‌کنند که سبب هیدرولیز پروتئین می‌شوند از این رو روش مقرون به صرفه‌تر نسبت به هیدرولیز با آنزیم‌های تجاری می‌باشد (Agyei & Danquah, 2011). گونه‌های *باسیلوس* معمولاً فعالیت پروتئولیتیکی بالایی داشته و می‌توانند اندوپپتیدازهای مختلف را در محیط تخمیر تولید کنند. فعالیت اندوپپتیدازها در محیط حاوی پروتئین سبب تولید پپتیدهایی با اندازه کوچک و آمینواسیدهای آزاد در مقادیر بالاتر نسبت به هیدرولیز آنزیمی می‌شود که یکی از مزایای استفاده از گونه‌های *باسیلوس* با فعالیت پروتئولیتیک بالا نسبت به آنزیم خالص می‌باشد (Zhang *et al*., 2014).

در مطالعات اخیر از پروتئین‌های ضایعات کشاورزی و صنعتی جهت تولید پپتیدهای زیست‌فعال با بیشینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی استفاده شده است (Wouters *et al*., 2016).

کنجد با نام علمی (*Sesamum indicum* L.) دانه روغنی شناخته شده‌ای است. کنجاله کنجد منبع اصلی پروتئین دانه است و حاوی حدود ۴۰ تا ۶۰ درصد پروتئین و با اهمیت فیزیولوژیکی بالا است (Liu *et al*., 2015). پروتئین ایزوله کنجاله کنجد پس از استخراج روغن، غنی از لوسین، آرژنین و متیونین است. مطالعات اخیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اثر ضد چربی خون ایزوله پروتئین کنجد را در موش‌های صحرایی آلبینو نشان داده است (Yamauchi *et al*., 2006). در مقایسه با تحقیقات انجام شده روی پپتیدهای ضد باکتری مشتق شده از میکروارگانیسم‌ها، مطالعات کمی روی شناسایی پپتیدهای ضد باکتری تولید شده از پروتئین گیاهی وجود دارد.

بطور کلی هدف از انجام این پژوهش بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کنجد با تخمیر توسط *باسیلوس سابتیلیس* برای دستیابی به پروتئین هیدرولیز شده با بیشترین فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌آکسیدانی (مهار رادیکال DPPH، احیاءکنندگی یون آهن) می باشد.

مواد و روش‌ها

مواد: تری کلرواستیک اسید، DPPH[2] (شرکت سیگما)، پتاسیم فری سیانید، فریک کلرید، محیط‌کشت نوترینت آگار، مولر هینتون براث (مرک آلمان)، کنجاله کنجد از شرکت (صنایع غذایی کشاورز، قم) تهیه شد.

سویه‌های میکروبی: *اشرشیاکلای* ATCC: ۲۵۹۲۲، *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC: ۲۵۹۲۳، *لیستریا مونوسیتوژنز* ATCC:۱۳۹۳۲، *کلستریدیوم پرفرنجنس* ATCC: ۱۳۱۲۴ و *باسیلوس سابتیلیس* ATCC: ۱۲۷۱۱ از کلکسیون قارچها و باکتری های صنعتی ایران خریداری شد.

آماده‌سازی نمونه و چربی‌گیری: ابتدا کنجاله کنجد با آسیاب الکتریکی آسیاب و با هگزان به نسبت ۱ به ۱۰ (وزنی-حجمی) چربی زدایی شد و به‌مدت ۳ ساعت در دمای اتاق با دور ۱۵۰ rpm همزده، و برای جداسازی هگزان از قیف بوخنر استفاده شد. سپس در آون با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد خشک شده و بعد از عبور از الک با مش ۴۰ در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد (Kaur & Singh, 2007).

تهیه ایزوله پروتئین کنجاله کنجد: پودر کنجاله کنجد چربی زدائی شده به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مخلوط و pH آن توسط NaoH یک مولار به ۱۱ رسانده شد و به‌طور مداوم با همزن مغناطیسی به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۵-۵۰ درجه‌سانتی‌گراد همزده شد سپس با دور ۶۰۰۰ rpm به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

1- Antimicrobial peptides

2- 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

سانتریفوژ (Hanil Co, Combi 514R, South Korea) شد تا ناخالصی‌ها رسوب کند. در ادامه pH مایع روئی با اسید کلریدریک ۱ نرمال به ۴ (pH ایزوالکتریک) رسانده و به‌مدت ۲۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰rpm سانتریفوژ شد و رسوب حاصل جدا و خشک شده و جهت انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شد (Chatterjee *et al*., 2015).

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی: آزمون‌های شیمیایی شامل درصد رطوبت بر اساس AACC 44-15، پروتئین با روش کجلدال AACC 46-12، خاکستر AACC 08-01 و چربی با روش سوکسله AACC 30-20 اندازه‌گیری شد (AACC., 1999).

فعالیت پروتئازی در محیط آگار: برای انجام آزمایش ابتدا محیط‌کشت نوترینت آگار و آب مقطر حاوی ۱/۵٪ پروتئین کنجاله کنجد (در دمای ۱۱۰°C به‌مدت ۱۰ دقیقه) جداگانه استریل و به مقدار ۱:۱ مخلوط شدند. سپس در پلیت ریخته و از باکتری *باسیلوس سابتیلیس* ۱۰ میکرولیتر به‌صورت نقطه‌ای با غلظت 10^8 cfu/ml به محیط نوترینت آگار اضافه و در طی ۲۴ و ۴۸ ساعت قطر هاله شفاف اندازه‌گیری شد (Pant *et al*., 2015).

تهیه پروتئین هیدرولیز شده با تخمیر: در بهینه‌سازی فرآیند تخمیر، نمونه پروتئین با غلظت‌های (۶-۲ درصد) با سوسپانسیون باکتریایی حاوی $1/5\times10^8$ cfu/ml (۲ درصد حجمی/حجمی) تلقیح و گرمخانه‌گذاری در محدوده دمایی (۳۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد) و ۱۵۰ دور در دقیقه انجام شد. تخمیر در محدوده زمانی (۱۲ تا ۳۶ ساعت) صورت گرفت و سپس با دور ۸۰۰۰ rpm به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. مایع روئی با فیلتر ۰/۴۵ میکرون فیلتر شده و pH آن به ۶/۵ رسانده شد و در ادامه نمونه‌ها توسط خشک‌کن انجمادی (Ningbo Dscientz Technology Co, Ltd, China) خشک شده و آزمون ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH، احیاءکنندگی آهن) روی تیمارها انجام و نمونه بهینه انتخاب شد.

آزمون ضد میکروبی: فعالیت ضد میکروبی پروتئین‌های هیدرولیز شده کنجاله کنجد با روش (Aguilar *et al*., 2017) انجام شد. باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلای، لیستریا مونوسیتوژنز، کلستریدیوم پرفرنجنس*، از قبل روی محیط‌کشت مولر هینتون آگار فعال‌سازی شدند. ۲۰ میلی‌گرم پروتئین هیدرولیز شده در ۹۰۰ میکرولیتر محیط‌کشت مولر هینتون براث حل شد و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی با غلظت 10^5 cfu/ml اضافه و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انجام شد و میزان کدورت ایجاد شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Uv-vis (BMG Labtech Co, SPECTROstar Nano, USA) با استفاده از میکروپلیت در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. نمونه کنترل منفی حاوی محیط‌کشت و پروتئین هیدرولیز شده و نمونه کنترل مثبت حاوی محیط‌کشت و سوسپانسیون باکتری با غلظت cfu/ml 10^5 بود. درصد مهارکنندگی مطابق فرمول زیر بدست آمد: (A جذب نوری باکتری، B جذب نوری نمونه با باکتری و C جذب نوری نمونه)

$$\text{درصد مهار کنندگی رشد میکروارگانیسم} = \frac{A-(B-C)}{A}\times 100$$

آزمون آنتی‌اکسیدانی

اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال آزاد (DPPH): برای فعالیت مهار رادیکال DPPH، ابتدا ۲۰ میلی‌گرم از پروتئین هیدرولیز شده در یک میلی‌لیتر آب مقطر حل و ۵۰۰ میکرولیتر از آن با ۳۷۵ میکرولیتر اتانول ۹۹/۸ ٪ ترکیب و ۱۲۵ میکرولیتر محلول DPPH ۰/۱۵ میلی‌مولار به آن اضافه شد و ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت و در ادامه جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. در نمونه شاهد به جای پروتئین هیدرولیز شده از آب مقطر استفاده شد. درصد مهار کنندگی با استفاده از فرمول زیر بدست آمد (Jemil *et al*., 2014).

$$\text{درصد مهار کنندگی رادیکال DPPH} = \frac{\text{جذب شاهد} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب شاهد}}\times ۱۰۰$$

اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی یون Fe^{3+}: برای انجام این آزمون ۵۰۰ میکرولیتر از پروتئین هیدرولیز شده در غلظت mg/mL ۲۰ با ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار و ۵۰۰ میکرولیتر پتاسیم فری سیانید مخلوط و به‌مدت یک دقیقه همزده شد سپس، مخلوط در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. در ادامه تری‌کلرو استیک اسید ۱۰ درصد به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر به ترکیب اضافه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سوپرناتانت حاصل با فریک کلراید ۰/۱ درصد وزنی-حجمی مخلوط و ۱۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد و جذب نمونه در ۷۰۰ نانومتر قرائت شد (Bougatef *et al*., 2009).

آنالیز آماری: در این پژوهش بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز با استفاده از نرم‌افزار Design Expert نسخه ۷ و روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی انجام شد. متغیرهای مستقل شامل دما، زمان و غلظت سوبسترا در ۵ سطح و ۲ تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند. معنی‌دار بودن آزمون پروتئازی در سطح ۵ درصد و با مقایسه میانگین تیمارها به‌وسیله آزمون دانکن با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام شد.

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی: میزان رطوبت، چربی، پروتئین و خاکستر کنجاله کنجد خام در جدول ۱ آورده شده است. دانه کنجد جدا از اینکه منبع مهم دانه‌های روغنی است، منبع بالقوه پروتئین نیز می باشد. کنجاله کنجد محصول جانبی پس از استخراج روغن از دانه کنجد است که می‌تواند به‌عنوان منبع پروتئینی در صنعت غذا استفاده شود. با توجه به نتایج، مقدار پروتئین کنجاله ۲۷/۳ ٪ و درصد چربی ۱۶/۲ بدست آمد. اونسارد و همکاران (Onsaard *et al.*, 2010) مقدار پروتئین کنجاله کنجد را ۳۰/۵۶٪، چربی ۲۷/۸۳٪، خاکستر ۵/۲۷ ٪ و مقدار رطوبت را ۷/۹۲ ٪ گزارش کردند. مقدار درصد چربی کنجاله بسته به انواع روش‌های روغن‌گیری در صنعت متفاوت می باشد. ترکیبات دانه کنجد به عوامل ژنتیکی، رقم، شرایط آب و هوایی، مرحله رسیدگی و زمان برداشت بذر بستگی دارد (Nweke *et al.*, 2011).

فعالیت پروتئازی: فعالیت پروتئازی *باسیلوس سابتیلیس* به روش نقطه‌گذاری در محیط نوترینت آگار حاوی پروتئین کنجاله کنجد در طی زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. قطر هاله شفاف در ۲۴ ساعت اول ۱۳/۸۲ میلی‌متر و تا ۴۸ ساعت ۲۳/۶۶ میلی‌متر بدست آمد. نتایج نشان داد که با گذشت زمان تا ۴۸ ساعت قطر هاله شفاف ایجاد شده به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۵) افزایش یافت که نشان‌دهنده این است که *باسیلوس سابتیلیس* می‌تواند نیازهای غذایی خود را به‌عنوان منبع نیتروژن از پروتئین کنجد تأمین کند. در پژوهش انجام شده توسط محققان از ژلاتین به‌عنوان منبع پروتئین در محیط نوترینت آگار استفاده شد که پس از ۲۴ ساعت کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله شفاف ۲۲ میلی‌متر گزارش شد که به دلیل تولید آنزیم پروتئاز توسط سویه *باسیلوس سابتیلیس* بود (Pant *et al.*, 2015). هاله ایجاد شده توسط این سویه نشان داد که *باسیلوس سابتیلیس* دارای فعالیت پروتئولیتیکی بالایی بوده و می‌تواند باکتری مناسبی جهت هیدرولیز پروتئین کنجد با هدف دستیابی به هیدرولیزات با بالاترین فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی باشد.

تأثیر زمان، دما و غلظت سوبسترا بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی: نتایج حاصل از فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و قدرت احیاءکنندگی یون آهن در جدول ۲ آورده شده است. در ارتباط با قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH و احیاءکنندگی یون آهن با توجه به مقادیر عدد P در جدول ۳، اثر زمان (B) غلظت سوبسترا (C)، متغیرهای A^2(توان دوم دما)، B^2(توان دوم زمان) و C^2 (توان دوم غلظت سوبسترا) معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). همچنین رابطه قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH و احیاءکنندگی یون آهن با هر یک از متغیرهای مستقل بصورت درجه دوم و دارای ضریب همبستگی به‌ترتیب ۰/۸۴۶۸ و ۰/۸۲۸۱ می‌باشد یعنی مدل توانسته است ۸۴ و ۸۲ درصد از کل تغییرات در دامنه متغیرهای مورد بررسی را توصیف کند و از معادله ۱ و ۲ تبعیت می کند.

بطور کلی خصوصیات زیست‌فعالی پروتئین هیدرولیز شده به ترکیبات آمینواسید، توالی و وزن مولکولی آمینواسیدها بستگی دارد (AbdRashid *et al.*, 2022). علاوه بر این محتوای بالای آمینواسیدهای قطبی و آروماتیک می‌تواند قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH و احیاءکنندگی یون آهن را افزایش دهد. فعالیت پروتئازی در محیط تخمیر به پارامترهای دما، مدت زمان گرمخانه‌گذاری و pH اولیه محیط بستگی دارد. با توجه به شکل ۱-a و ۱-b با افزایش دما و مدت زمان تخمیر تا مقدار بهینه قدرت آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH و احیاءکنندگی یون آهن) افزایش یافت. بیشترین مقدار مهار کنندگی رادیکال DPPH در ۳۷/۵ درجه سانتی‌گراد و و مدت زمان ۲۴ ساعت و کمترین مقدار آن مربوط به مدت زمان ۳/۸ ساعت بود. در ارتباط با قدرت احیاءکنندگی نیز در مدت ۲۴ ساعت بعد از تخمیر بیشترین قدرت احیاءکنندگی بدست آمد. هوانگ و همکاران (Huang *et al.*, 2011) گزارش کردند که دما فاکتور مهم بر فعالیت آنتی اکسیدانی در طول دوره تخمیر می‌باشد و دمای بالاتر تأثیر بهتری بر شدت فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشته است. افزایش درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH می‌تواند ناشی از هیدرولیز بیشتر پروتئین‌ها و تولید پپتیدها و آمینواسیدهای آزاد قطبی و آروماتیک باشد (Lim *et al.*, 2019). پروتئین‌های هیدرولیز شده با قدرت احیاءکنندگی بالاتر به عنوان دهنده الکترون و هیدروژن عمل می‌کنند. رادیکال‌های آزاد، الکترون را از پپتیدها دریافت کرده و به محصولات واسطه‌ای پایدار و بی ضرر تبدیل می‌شوند (Zhu *et al.*, 2008).

جدول ۱- نتایج ترکیبات شیمیایی کنجاله کنجد خام

Table 1- The results of the chemical composition of raw sesame meal

رطوبت Moisture (%)	خاکستر Ash (%)	چربی Fat (%)	پروتئین Protein (%)
9.54±0.05	6.25±0.1	16.2±0.17	27.7±1.7

جدول ۲- اثر متغیرهای دما، زمان و غلظت سوبسترا بر ویژگی آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کنجد

Table 2- Effect of temperature, time and substrate concentration variables on antioxidant and antimicrobial properties of sesame protein hydrolysate.

تیمار Treatment	A	B	C	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6
1	37.5	24	4	60.4	0.989	55.3	42.8	58.8	48.8
2	37.5	3.818	4	10.5	0.241	5.6	6.3	10	12.3
3	45	36	6	55.6	0.786	50	40.8	52.2	45.5
4	45	12	2	25.3	0.533	12.6	13.6	11.8	10.6
5	37.5	24	7.363	58.6	0.943	54	42.02	56	49
6	37.5	24	4	60.8	0.82	56.8	40.8	57	47.3
7	37.5	24	4	61	0.978	52.6	44.5	55.6	47
8	37.5	44.181	4	50.3	0.844	50.3	36.2	53.4	45.6
9	37.5	24	4	62.5	0.972	55	39.9	59.7	36
10	37.5	24	0.636	26	0.506	18.9	25.4	22.33	15.6
11	30	36	6	54.8	0.707	47.5	32	43.28	42.8
12	37.5	24	4	58.8	0.962	58.2	38.8	46.63	46.6
13	45	12	6	28.6	0.582	20.8	18.6	12.54	8.4
14	24.886	24	4	42.3	0.479	30.2	24.4	28.68	33.2
15	37.5	24	4	45.8	0.963	42.6	45	56.14	43
16	30	12	2	15.8	0.376	8.6	12.8	10.85	8.4
17	30	36	2	50.2	0.674	46	23	45.4	38.8
18	50.113	24	4	40.9	0.445	39.9	36.6	40.9	30.6
19	30	12	6	18.8	0.395	19.7	11.8	8.92	10.7
20	45	36	2	48.8	0.768	40.7	33.4	49.9	39.6

A (دما، درجه سانتی‌گراد) B (زمان، ساعت) C (غلظت سوبسترا، درصد) Y1 (مهارکنندگی رادیکال DPPH، درصد) Y2 (قدرت احیاءکنندگی یون آهن)، Y3 (مهارکنندگی *استافیلوکوکوس اورئوس*، درصد) Y4 (مهارکنندگی *اشرشیاکلای*، درصد) Y5 (مهارکنندگی *لیستریا مونوسیتوژنز*، درصد) Y6 (مهارکنندگی *کلستریدیوم پرفرنجنس*، درصد)

A (temperature,ċ) B (time, hour) C (substrate concentration, %) Y1 (DPPH radical scavenging, %) Y2 (reducing power), Y3 (*S. aureus* inhibition, %) Y4 (*E. coli* inhibition, %) Y5 (*L. monocytogenes* inhibition, %) Y6 (*C. perfringens* inhibition, %)

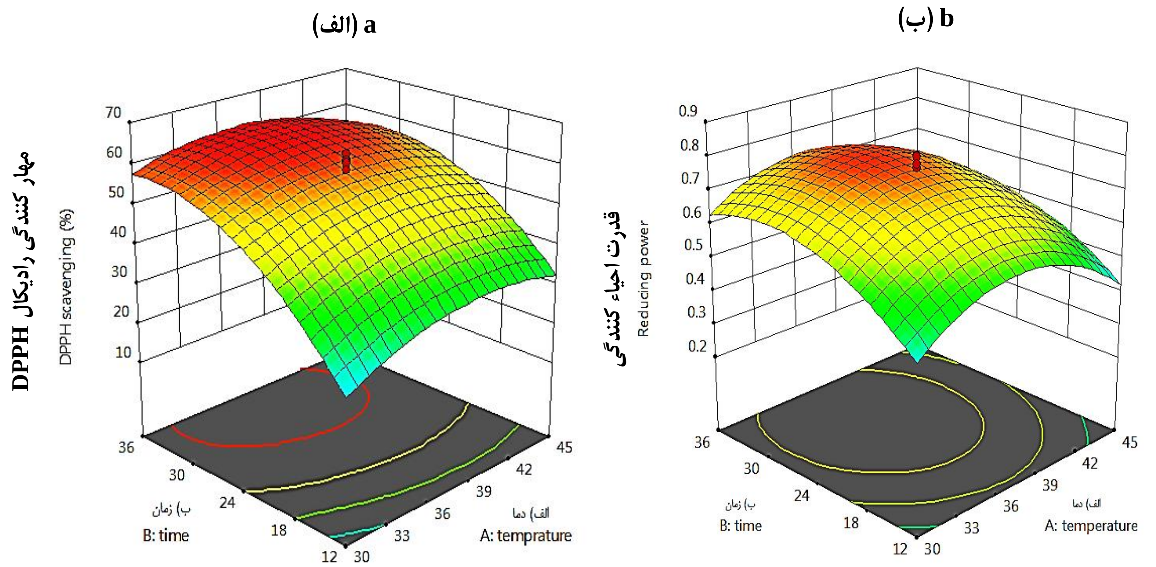
جدول ۳- نتایج آنالیز واریانس پاسخ‌های مختلف در هیدرولیز پروتئین کنجاله کنجد

Table 3- The results of the analysis of variance for different responses in sesame meal hydrolysis

Responses / Variables	DPPH scavenging مهارکنندگی رادیکال DPPH	Reducing power قدرت احیاءکنندگی یون اهن	*S. aureus* inhibition مهارکنندگی *استافیلوکوکوس اورئوس*	*E. coli* inhibition مهار کنندگی *اشرشیاکلای*	*L. monocytogenes* inhibition مهار کنندگی لیستریا *مونوسیتوژنز*	*C. perfringens* inhibition مهارکنندگی *کلستریدیوم پرفرنجنس*
			P-value (P عدد)			
Model	0.0002	17.13	< 0.0001	< 0.0001	0.0004	0.0016
A:temperature	0.5194	0.7041	0.4210	0.0042	0.2158	0.9728
B:time	< 0.0001	79.42	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	<0.0001
C:concentration	0.0142	16.15	0.0024	0.0037	0.0856	0.0385
AB	0.3131	0.2165	0.6517	0.2654	0.7001	0.8689
AC	0.8965	0.0833	0.7788	0.6641	0.7573	0.9051
BC	0.7910	0.2507	0.6274	0.2359	0.9523	0.6547
A^2	0.0077	18.19	0.0017	0.0003	0.0025	0.0190
B^2	0.0002	34.25	0.0002	< 0.0001	0.0011	0.0078
C^2	0.0098	15.62	0.0027	0.0018	0.0084	0.0215
Lack of fit	0.3937	1.28	0.3967	0.1431	0.0579	0.0742
R^2	0.9196	0.9095	0.9391	0.9588	0.9109	0.8781
AdjustedR^2	0.8472	0.8281	0.8843	0.9218	0.8306	0.7684

A (دما)، B (زمان)، C (غلظت سوبسترا)، AB (اثر متقابل دما و زمان)، AC (اثر متقابل دما و غلظت)، BC (اثر متقابل زمان و غلظت)، A^2(توان دوم دما)، B^2(توان دوم زمان)، C^2(توان دوم غلظت)، Lack of fit (شاخص عدم برازش)

A (temperature), B (time), C (substrate concentration), AB (interaction of temperature and time), AC (interaction of temperature and concentration), BC (interaction of time and concentration), A^2 (square of temperature), B^2 (squared of time), C^2 (squared of concentration), Lack of fit



شکل ۱- الف: اثر دما و زمان تخمیر بر فعالیت مهار کنندگی DPPH ب: اثر دما و زمان تخمیر بر قدرت احیاء کنندگی یون آهن

Fig. 1. a: The effect of temperature and fermentation time on DPPH radical scavenging activity, b: The effect of temperature and fermentation time on the reducing power

(۱)

قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH= $58.20+1.19A+13.75B+5.31C-2.48AB+0.31AC+0.63BC-5.79A^2-9.7B^2-5.5C^2$

(۲)

قدرت احیاکنندگی یون آهن= $0.945+0.033A+0.15B+0.062C-0.021AB+0.001AC-0.002BC-0.161A^2-0.132B^2-0.068C^2$

تأثیر زمان، دما و غلظت سوبسترا بر فعالیت ضد میکروبی:

نتایج حاصل از اثر ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده در جدول ۲ آمده است. با توجه به آنالیز واریانس ذکر شده در جدول ۳ و مقادیر عدد P اثر زمان و غلظت سوبسترا و متغیرهای A^2، B^2 و C^2 بر مهارکنندگی *استافیلوکوکوس اورئوس* معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). رابطه مهارکنندگی *استافیلوکوکوس اورئوس* با هر یک از متغیرهای مستقل به‌صورت درجه دوم و با ضریب همبستگی ۰/۸۸۴۳ بود که توانایی خوب مدل را در تأثیر متغیرهای مستقل بر متغیرهای وابسته نشان داد. همچنین با توجه به جدول ۳ معنی‌دار نبودن شاخص عدم برازش (p>۰/۰۵) نشان داد که مدل به اندازه کافی می‌تواند تغییرات در مقادیر داده‌ها را توصیف کند. معادله ۳ با توجه به ضریب همبستگی و معنی‌داری ضرایب برای پاسخ مورد نظر پیشنهاد شد.

در مورد مهارکنندگی *اشرشیاکلای* نیز رابطه آن با هر یک از متغیرهای مستقل به‌صورت معادله درجه دوم و با ضریب همبستگی ۰/۹۲۱۸ بود که مدل توانست ۹۲٪ از کل تغییرات در دامنه متغیرهای مورد بررسی را توضیح دهد.

در ارتباط با سویه *لیستریا مونوسیتوژنز* با توجه به جدول ۳، اثر زمان و متغیرهای A^2، B^2 و C^2 بر مهارکنندگی *لیستریا مونوسیتوژنز* معنی‌دار بوده (p<۰/۰۵) و متغیر زمان تأثیر بیشتری بر قدرت مهارکنندگی داشت. معادله ۵ بر اثر مهارکنندگی *لیستریا مونوسیتوژنز* بیشنهاد شد.

همچنین اثر زمان، غلظت سوبسترا و متغیرهای A^2، B^2 و C^2 بر مهارکنندگی *کلستریدیوم پرفرنجنس* و با ضریب همبستگی ۰/۷۶۸۴ معنی‌دار بود (p<۰/۰۵)، یعنی مدل توانسته ۷۶٪ از کل تغییرات در دامنه متغیرهای مورد بررسی را توصیف کند. بنابراین معادله ۶ برای مهارکنندگی *کلستریدیوم پرفرنجنس* پیشنهاد شد.

(۳)

اثر مهارکنندگی *استافیلوکوکوس اورئوس*= $53.45+1.36A+14.47B+6.52C-0.98AB+0.61AC-1.06BC-6.74A^2-9.25B^2-6.24C^2$

(۴)

اثر مهارکنندگی *اشرشیاکلای*= $42.10+3.46A+8.98B+3.54C+1.45AB+0.55AC+1.55BC-4.98A^2-8.25B^2-3.85C^2$

(۵)

اثر مهارکنندگی *لیستریا مونوسیتوژنز* = $55.79+2.82A+16.08B+4.07C+1.10AB+0.88AC+0.17B-8.34A^2-9.44B^2-6.8C^2$

(۶)

$$\text{اثر مهارکنندگی کلستریدیوم پرفرنجنس} = 44.93 - 0.07A + 13.5B + 4.84C + 0.45AB - 0.32AC + 1.22BC - 5.52A^2 - 6.5B^2 - 5.38C$$

گزارش شده است که فاکتورهای متعددی مثل گونه میکروبی، pH، دما، زمان تخمیر و نوع سوبسترا فعالیت زیست‌فعالی پپتیدها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Hur *et al*., 2014). افزایش غلظت و زمان تأثیر معنی‌داری در فعالیت ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده داشت که بیشترین درصد مهارکنندگی برای *استافیلوکوکوس اورئوس* ۵۸/۲٪، *اشرشیاکلای* ۴۴/۵٪، *لیستریا مونوسیتوژنز* ۵۹/۷٪ و *کلستریدیوم پرفرنجنس* ۴۸/۸ درصد بود (جدول ۲). بطور کلی نحوه عمل و اثرگذاری ماده ضد میکروب به ویژگی ساختاری و اختصاصیت آنها روی پاتوژن هدف بستگی دارد (Bhat *et al*., 2015). با توجه به شکل ۲–a و ۲–b افزایش زمان تخمیر تا ۲۴ ساعت باعث افزایش درصد مهارکنندگی میکروارگانیسم‌ها شد اما با گذشت زمان تخمیر تا ۴۴ ساعت درصد مهارکنندگی کاهش یافت که به‌دلیل سیستم پپتیدازی میکروارگانیسم‌ها می‌باشد که می‌تواند منجر به هیدرولیز ثانویه پپتیدها شده و یا پپتیدها توسط سلول باکتری به‌عنوان منبع نیتروژن مصرف شود (Li & Wang, 2021). دما نیز فاکتور مهمی در فرآیند تخمیر می‌باشد که برای سویه *باسیلوس سابتیلیس* با توجه به شکل ۲ تخمیر در دمای بالا نتیجه بهتری داشت. در شکل ۲–b و ۲–c که روند تأثیر غلظت و دما را بر مهارکنندگی *اشرشیا کلای* و *کلستریدیوم پرفرجنس* نشان می‌دهد با افزایش دما و افزایش غلظت اثر مهارکنندگی افزایش یافت. اما افزایش غلظت، بیشتر از مقدار بهینه سبب کاهش اثر مهارکنندگی میکروارگانیسم شد. محققان گزارش کردند که غلظت سوبسترا تا مقدار بهینه فاکتور مهمی در مهارکنندگی میکروارگانیسم می‌باشد اما افزایش غلظت بیشتر از مقدار بهینه منجر به کاهش فعالیت پروتئازی آنزیم شده و شدت هیدرولیز کمتر می‌شود (Jemil *et al*., 2014).

محققان گزارش کردند که یک همبستگی قوی بین درجه هیدرولیز و اندازه پپتیدها وجود دارد. همچنین بیان کردند که پپتیدهایی با اندازه کوچکتر ممکن است اتصال بهتری با غشای باکتری برقرار نمایند، لذا اثر ضد میکروبی بیشتری به جای می‌گذارند (Trang *et al*., 2018). با توجه به گزارش‌های موجود، در این مطالعه نیز اثر ضد میکروبی هیدرولیز شده‌ها ممکن است به‌دلیل درجه هیدرولیز بالاتر و تولید پپتیدهایی با اندازه کوچکتر توسط سویه *باسیلوس سابتیلیس* باشد.

پپتیدهای ضد میکروبی از طریق بار مثبت اسیدهای آمینه در انتهای زنجیره (آمفی‌پاتیک) با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا واکنش می‌دهند. اثبات شده است که قدرت ضد میکروبی پپتیدهای کاتیونی به‌طور مستقیم با بار، آب‌گریز بودن و طول پپتید در ارتباط است (Pane *et al*., 2017). پروتئین‌های هیدرولیز شده با فعالیت ضد میکروبی ممکن است مستقیماً باکتری را با ایجاد منافذ در غشای سلول و یا از طریق برهمکنش با ماکرومولکول‌های داخل سلول‌های میکروبی از بین ببرند (Taniguchi *et al*., 2016). به‌دنبال اتصال پپتیدهای ضد میکروبی به غشای سلولی، در نتیجه برهم زدن یکپارچگی غشاء و در نتیجه نشت مواد داخل سلول، دپلاریزاسیون و عدم تعادل اسمزی، تورم سلول‌ها و در نهایت تخریب سلولی، مرگ سلولی رخ می‌دهد.

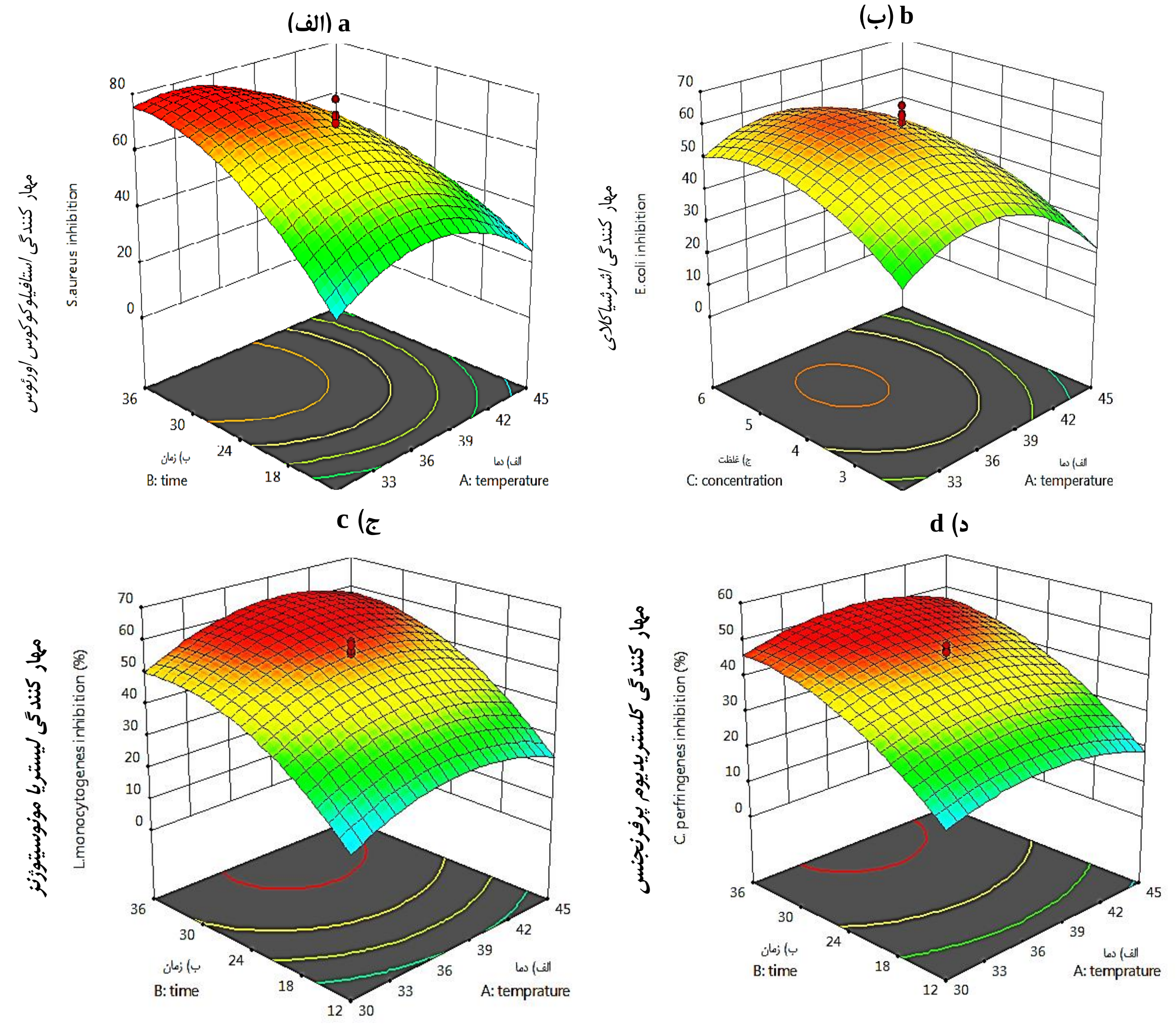
طبق گفته ورما و همکاران (Verma *et al*., 2017) متغیرهای مستقل (از جمله زمان هیدرولیز) ممکن است درجه هیدرولیز پپتید را بسته به نوع آنزیم افزایش دهد. فعالیت خاص پپتیدهای ضد میکروبی توسط نوع و موقعیت قرارگیری اسیدهای آمینه در ساختار اولیه آنها تعیین می‌شود. اسیدهای آمینه مانند تریپتوفان، تیروزین، سیستئین، متیونین، لیزین، هیستیدین و آرژنین نقش مهمی در تعیین خواص ضد میکروبی پپتیدها ایفا می‌کنند. نوع آنزیم یکی از عوامل مهمی است که بر زیست فعالی هیدرولیز شده‌های بدست آمده تأثیر می‌گذارد. از دیدگاه اقتصادی، پروتئاز با منشأ میکروبی پتانسیل بالایی برای استفاده در صنعت به‌دلیل هزینه نسبتاً پایین آن در مقایسه با آنزیم های تجاری دارد (Pokora *et al*., 2013). بر اساس نتایج حاصل (جدول ۲)، پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کنجد اثر مهارکنندگی بیشتری علیه باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری گرم منفی (*اشرشیا کلای*) نشان داد. محققان گزارش کردند که تفاوت در حساسیت به ترکیبات ضد میکروب بین باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را می‌توان به ساختار و ترکیب پوشش سلولی شامل (غشاء سیتوپلاسمی و یا غشای خارجی و دیواره سلولی) نسبت داد (Lopez - Romero *et al*., 2015) وجود غشای خارجی فسفولیپیدی و لیپوپلی‌ساکاریدی در دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی مقاومت این باکتری‌ها را در برابر ترکیبات ضد میکروبی افزایش داده است (Lee & Nguyen, 2015).

اعتبارسنجی مدل: نتایج مربوط به مهارکنندگی رادیکال DPPH، قدرت احیاءکنندگی یون آهن، مهارکنندگی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلای*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *کلستریدیوم پرفرنجنس* در جدول ۲ آورده شده است. شرایط بهینه هیدرولیز توسط نرم‌افزار دمای ۳۹/۶۸ درجه سانتی‌گراد، زمان ۳۰/۰۸ ساعت و غلظت ۴/۸۵ درصد تعیین شد. تحت این شرایط هیدرولیز شده‌هایی با بیشترین فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی تولید شد. در شرایط بهینه ارائه شده توسط مدل، قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH ۶۳/۵۷ درصد قدرت احیاءکنندگی یون آهن ۰/۹۹۵۱، مهارکنندگی *استافیلوکوکوس*

اورئوس ۵۹/۵۸٪، *اشرشیاکلای* ۴۶/۵۵٪، *لیستریا مونوسیتوژنز* ۶۲/۴۳ ٪ و *کلستریدیوم پرفرنجنس* ۵۰/۹۷٪ تعیین شد. پروتئین هیدرولیز شده تولیدی در شرایط بهینه انجام و با داده‌های پیش‌بینی شده مقایسه و قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH ۶۱/۷۶٪، قدرت احیاءکنندگی یون آهن ۰/۹۸۶۶، مهارکنندگی *استافیلوکوکوس اورئوس* ۶۱/۳۸٪، *اشرشیاکلای* ۴۲/۰۸٪، *لیستریا مونوسیتوژنز* ۵۸/۸۳ ٪ و *کلستریدیوم پرفرنجنس* ۵۴/۴۲ ٪ گزارش شد. نتایج نشان دهنده توانایی خوب مدل در پیش‌بینی اثر متغیرهای مستقل بر آزمون‌های مورد بررسی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به عوارض ناشی از آنتی‌بیوتیک‌ها، در این تحقیق به بررسی امکان استفاده از پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کنجد تولیدی توسط *باسیلوس سابتیلیس* به‌عنوان ترکیب طبیعی دارای خاصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی پرداخته شد. نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کنجد می‌تواند به‌عنوان عامل ضد میکروب طبیعی جهت مهار باکتری‌های بیماری‌زا و همچنین آنتی اکسیدان طبیعی مورد استفاده قرار بگیرد.



شکل ۲- الف: اثر دما و زمان تخمیر بر مهار کنندگی *استافیلوکوکوس اورئوس*، ب: اثر دما و غلظت سوبسترا بر مهار کنندگی *اشرشیاکلای*، ج: اثر دما و زمان تخمیر بر مهار کنندگی *لیستریا مونوسیتوژنز*، د: اثر دما و غلظت سوبسترا بر مهار کنندگی *کلستریدیوم پرفرنجنس*.

Fig. 2. a: The effect of temperature and fermentation time on the inhibition of *S. aureus*, b: The effect of temperature and substrate concentration on the inhibition of *E. coli*, c: The effect of temperature and fermentation time on the inhibition of *L. monocytogenes*, d: The effect of temperature and substrate concentration on the inhibition of *C. perfringens*.

میزان مشارکت

پریسا راعی: مفهوم‌سازی، مدیریت داده‌ها، تحلیل رسمی، تحقیق و بررسی، روش‌شناسی، منابع، نرم‌افزار؛ **مرتضی خمیری:** نوشتن-پیش‌نویس اصلی، نوشتن-بررسی و ویرایش، نظارت، مدیریت پروژه؛ **علیرضا صادقی ماهونک:** نوشتن-بررسی و ویرایش، نظارت؛ **علی مؤیدی:** نوشتن-بررسی و ویرایش، نظارت؛ **محبوبه کشیری:** نوشتن-بررسی و ویرایش، نظارت.

منابع تأمین مالی

بخشی از هزینه‌های اجرای این پژوهش توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان جهت اجرای رساله دکتری تأمین شده است.

References

1. American Association of Cereal Chemists (AACC). (1999). Approved methods of the American Association of Cereal Chemists (Vol. 2). St. Paul, MN: AACC.
2. AbdRashid, N.Y., Manan, M.A., Pa'ee, K.F., Saari, N., & Wong, F.W.F. (2022). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of fish protein hydrolysate produced from Malaysian fish sausage (Keropok Lekor) by-products by indigenous *Lactobacillus casei* fermentation. *Journal of Cleaner Production, 347*, 131303. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131303
3. Aguilar-Toalá, J., Santiago-López, L., Peres, C., Peres, C., Garcia, H., Vallejo-Cordoba, B., & Hernández-Mendoza, A. (2017). Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, *100*(1), 65-75. https://doi.org/10.3168/jds.2016-11846
4. Agyei, D., & Danquah, M.K. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, *29*(3), 272-277. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.001
5. Bhat, Z., Kumar, S., & Bhat, H.F. (2015). Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*, *52*, 5377-5392. https://doi.org/10.1007/s13197-015-1731-5
6. Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, *114*(4), 1198-1205. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.075
7. Chatterjee, R., Dey, T.K., Ghosh, M., & Dhar, P. (2015). Enzymatic modification of sesame seed protein, sourced from waste resource for nutraceutical application. *Food and Bioproducts Processing*, *94*, 70-81. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.01.007
8. Cheng, G., Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., Huang, L., & Yuan, Z. (2014). Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? *Frontiers in Microbiology*, *5*, 217. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00217
9. Chokshi, A., Sifri, Z., Cennimo, D., & Horng, H. (2019). Global contributors to antibiotic resistance. *Journal of Global Infectious Diseases*, *11*(1), 36. https://doi.org/10.4103/jgid.jgid_110_18
10. Huang, Y.H., Lai, Y.J., & Chou, C.C. (2011). Fermentation temperature affects the antioxidant activity of the enzyme-ripened sufu, an oriental traditional fermented product of soybean. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *112*(1), 49-53. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.03.008
11. Hur, S.J., Lee, S.Y., Kim, Y.C., Choi, I., & Kim, G.B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, *160*, 346-356. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.112
12. Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Salem, R.B.S.-B., Mehiri, M., & Nasri, M. (2014). Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Process Biochemistry*, *49*(6), 963-972. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.004
13. Kaur, M., & Singh, N. (2007). Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, *102*(1), 366-374. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.029
14. Lee, S., & Nguyen, M.T. (2015). Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Network*, *15*(2), 51-57. https://doi.org/10.4110/in.2015.15.2.51
15. Lim, Y.H., Foo, H.L., Loh, T.C., Mohamad, R., & Abdullah, N. (2019). Comparative studies of versatile extracellular proteolytic activities of lactic acid bacteria and their potential for extracellular amino acid productions as feed supplements. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *10*, 1-13.
16. Li, W., & Wang, T. (2021). Effect of solid-state fermentation with *Bacillus subtilis* lwo on the proteolysis and the antioxidative properties of chickpeas. *International Journal of Food Microbiology, 338*, 108988. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108988
17. Liu, W., Cheng, G., Liu, H., & Kong, Y. (2015). Purification and identification of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from sesame meal. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 21*, 433-442.

18. Lopez-Romero, J.C., González-Ríos, H., Borges, A., & Simões, M. (2015). Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*. https://doi.org/10.1155/2015/795435
19. Moayedi, A., Hashemi, M., & Safari, M. (2016). Valorization of tomato waste proteins through production of antioxidant and antibacterial hydrolysates by proteolytic *Bacillus subtilis*: optimization of fermentation conditions. *Journal of Food Science and Technology*, *53*, 390-400. https://doi.org/10.1007/s13197-015-1965-2
20. Morone, P., Falcone, P.M., Imbert, E., Morone, M., & Morone, A. (2016). Tackling food waste through a sharing economy approach: an experimental analysis.
21. Nweke, F.N., Ubi, B.E., & Kunert, K.J. (2011). Determination of proximate composition and amino acid profile of Nigerian sesame (*Sesamum indicum* L.) cultivars. *Nigerian Journal of Biotechnology*, *23*.
22. Onsaard, E., Pomsamud, P., & Audtum, P. (2010). Functional properties of sesame protein concentrates from sesame meal. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, *3*(4), 420-431.
23. Ortiz-Martinez, M., Winkler, R., & García-Lara, S. (2014). Preventive and therapeutic potential of peptides from cereals against cancer. *Journal of Proteomics*, *111*, 165-183. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.044
24. Pane, K., Durante, L., Crescenzi, O., Cafaro, V., Pizzo, E., Varcamonti, M., & Notomista, E. (2017). Antimicrobial potency of cationic antimicrobial peptides can be predicted from their amino acid composition: Application to the detection of "cryptic" antimicrobial peptides. *Journal of Theoretical Biology*, *419*, 254-265. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.02.012
25. Pant, G., Prakash, A., Pavani, J., Bera, S., Deviram, G., Kumar, A., & Prasuna, R.G. (2015). Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science, 9*(1), 50-55. https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.04.010
26. Pokora, M., Eckert, E., Zambrowicz, A., Bobak, Ł., Szołtysik, M., Dąbrowska, A., & Trziszka, T. (2013). Biological and functional properties of proteolytic enzyme-modified egg protein by-products. *Food Science & Nutrition*, *1*(2), 184-195. https://doi.org/10.1002/fsn3.27
27. Taniguchi, M., Ochiai, A., Kondo, H., Fukuda, S., Ishiyama, Y., Saitoh, E., & Tanaka, T. (2016). Pyrrhocoricin, a proline-rich antimicrobial peptide derived from insect, inhibits the translation process in the cell-free *Escherichia coli* protein synthesis system. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 121*(5), 591-598. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.09.002
28. Trang, H., & Pasuwan, P. (2018). Screening antimicrobial activity against pathogens from protein hydrolysate of rice bran and Nile Tilapia by-products. *International Food Research Journal, 25*(5), 2157-2163.
29. Verma, A.K., Chatli, M.K., Kumar, P., & Mehta, N. (2017). Antioxidant and antimicrobial activity of protein hydrolysate extracted from porcine liver. *Indian Journal Animal Science, 87*, 711-717.
30. Wang, B., Li, L., Chi, C.-F., Ma, J.-H., Luo, H.-Y., & Xu, Y.-f. (2013). Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate. *Food Chemistry, 138*(2-3), 1713-1719. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.002
31. Wouters, A.G., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K., & Delcour, J.A. (2016). Relevance of the functional properties of enzymatic plant protein hydrolysates in food systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 15*(4), 786-800.
32. Yamauchi, K., Samanya, M., Seki, K., Ijiri, N., & Thongwittaya, N. (2006). Influence of dietary sesame meal level on histological alterations of the intestinal mucosa and growth performance of chickens. *Journal of Applied Poultry Research, 15*(2), 266-273. https://doi.org/10.1093/japr/15.2.266
33. Zhang, Y., Liu, J., Lu, X., Zhang, H., Wang, L., Guo, X., & Qian, H. (2014). Isolation and identification of an antioxidant peptide prepared from fermented peanut meal using *Bacillus subtilis* fermentation. *International Journal of Food Properties*, *17*(6), 1237-1253. https://doi.org/10.1080/10942912.2012.675605
34. Zhu, Y., Fan, J., Cheng, Y., & Li, L. (2008). Improvement of the antioxidant activity of Chinese traditional fermented okara (*Meitauza*) using *Bacillus subtilis* B2. *Food Control, 19*(7), 654-661. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.07.009